疎水性-セルファインは、多孔性球状セルロース粒子をベースとした、生体高分子に対して高吸着容量であり高流速が可能な疎水性相互作用-クロマトグラフィーメディア（HIC）です。アンチカオトロピックイオンの存在下でタンパク質を吸着します。一方、低イオン強度で不純タンパク質の除去の目的などにも使用されます。

（材料）

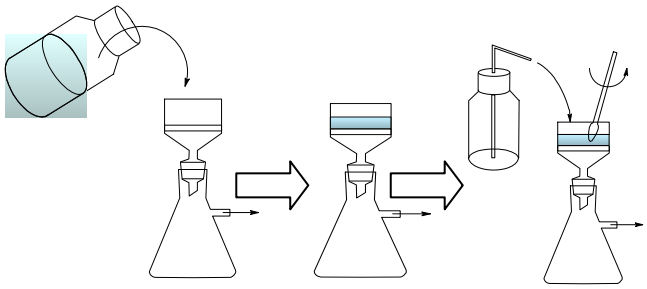
疎水性セルファイン　中低圧カラム(＊１)　ポンプ/吸引ビン

ガラスフィルターor ブフナーロート　充填バッファー(＊２)

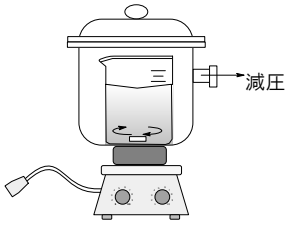
＊１　中低圧カラムは、各社の市販のカラムが使用できます。

＊２　充填バッファーは、吸着バッファーを用いる事を推奨します。

（ゲルスラリーの調整）



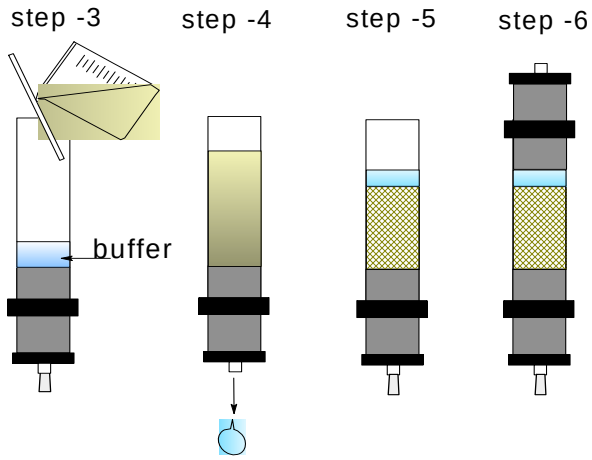
- 使用する材料を室温にする。
- 製品のボトルを数回振り、スラリーを均一にする。
- 吸引ろ過により保存剤（20%EtOH）を吸引除去する。
- 純水で EtOH 臭が無くなるまでろ過洗浄する。
- ビーカーに、脱水ゲルと充填バッファーを加え、良く撹拌した後、吸引ろ過をする（２～３回）。（充填バッファーは脱水ゲル容量のおおよそ１～1.5 倍使用する）
- ビーカーに、脱水ゲルと充填バッファーを加えおおよそ 40～60%のスラリーを調製し、減圧下で 30～40 分脱気する。




※脱気する際にマグネチックスターラーで緩やかに撹拌するとより効果的に脱気できます。

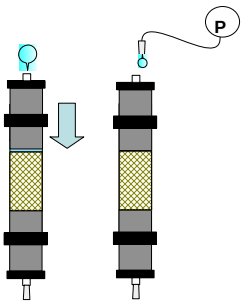
（カラムの充填）

1. カラムの組立て、操作方はカラムの取扱説明書を参照ください。
2. カラムの下部に栓をして少量の充填バッファーを加えておく。（カラムのゲルサポートは脱気しておく）
3. 脱気したゲルスラリーを良くかき混ぜて均一にして、カラム内へ注ぎ込む
4. カラムの下部よりバッファーを流出させて、ゲルベットを形成させる。
5. 目的の高さよりやや高い（1～2cm）位置までゲルベットを形成させ、更にゲルベッド上部の 1～2cm 上までバッファーを加えて、カラム下部にプラグをする。
6. カラム上部のゲルサポートをセットする。




（カラムの平衡化）

1. 充填したカラムをポンプにつなぎ、充填バッファーを流してゲルベットを安定化させます。送液圧力はおよそ 1～2MPa 以下で行います。
2. カラムベッドが安定したら（高さが安定したら）カラム高さを調整する。多い場合は駒込ピペットで取り除く、少ない場合はゲルを加える。
3. 希望のカラム高さになったら、ベッドサポートをゲルベッド上面に密着させる。




- カラム下部のプラグをする
- 上部サポーターを徐々に下ろす。（カラム上部出口より液がでてくる）
- 液の満たされたラインをカラム上部に接続する。

4. 充填バッファーをゲルベッド体積の５倍程度流す。

※平衡化が達成されれば、カラム溶出液のｐＨとイオン強度は、充填バッファーと同じになります。

（サンプルの調整）

添加するサンプルのイオン強度は、充填バッファー（吸着バッファー）と同じになるように調整します。 その調整方法は、吸着バッファーに対してサンプルを透析するか、より簡単な方法としては、セルファイン GH-25 によるバッファー交換ゲルろ過によってサンプルを調整する方法があります。サンプルの中の不溶物は、カラムへ添加する前に、メンブランフィルターで除去しておきます。

（流速）

サンプルの結合と溶出の際の流速は分離能に影響します。通常、流速が低い方が、より高い分離が得られます。

（吸着）

目的のサンプルを疎水性-セルファインに吸着させる場合、目的サンプルが塩析されずにしかも HIC に吸着される濃度に調整する必要があります。

※多用される塩類の HIC への吸着効果の順位

$PO_4^{3-}>SO_4^{2-}->CH_3COO^->Cl^->Br^->NO_3^->ClO_4^->I^->SCN^-$

$NH_4^+>K^+>Cs^+>Li^+>Mg^{2+}>Ca^{2+}>Ba^{2+}$

50ｍM 程度の中性のリン酸緩衝液に上記イオン（$(NH_4)_2SO_4$が一般的）を～２ M 程度含む緩衝液が使用されます。

（溶出）

- 目的物質の溶出には、緩衝液に含まれる硫酸アンモンなどのイオン濃度を、グラジエント法（あるいはステップワイズ法）で低くする事で達成されます。
- 上記方法で溶出されない場合は、40～50%のエチレングリコールや30%程度の IPA を流す方法、あるいは $Ca(SCN)_2$ などカオトロピックイオンを流す方法、操作温度を上げる方法などがあります。

（再生）

純水あるいは低イオン強度の緩衝液を使ってカラムの３～５倍量で洗浄します。その後、再び吸着バッファーで平衡化します。水や緩衝液で溶出しないものが存在する場合は、30%程度の IPA でカラムの３～５倍量洗浄します。その後、再び吸着バッファーで平衡化します。

(Cleaning-in-place (CIP) )

再生操作の後、0.1mol/L の NaOH をカラム体積の５倍程度流し送液を止め４時間から 16 時間程度放置する。ゲルの汚れが著しい場合は 1mol/L の NaOH をカラム体積の５倍程度流し、送液を止め４時間程度放置する。その後、吸着バッファーで平衡化する。

疎水性の強い物質を洗浄するためには、70%の EtOH や30%IPA で洗浄する。この場合、グラジエントで溶媒の濃度を上げ下げすることでカラムに気泡が発生することを避ける。

※有機溶剤を使用する場合、カラムに気泡が発生しやくなります。発生した場合は再度カラムの充填が必要です。

(保存)

開封後の疎水性-セルファインを保存する場合は、良く洗浄した後に、20%エタノールに液を置換して、２～８℃で保存することを推奨いたします。

(安定性)

耐熱性：オートクレーブ（120℃、20 分）による滅菌が可能

耐アルカリ：0.2mol/L NaOH で安定

耐酸：pH3 で安定

(疎水性-セルファイン製品リスト)

| 品名 | 容量 | Code No. |
|---|---|---|
| ミニカラム<br>セルファイン フェニル | 1 x 5ml | 19900-51 |
| セルファイン フェニル | 100mL | 19900 |
| | 500mL | 19901 |
| | 5 L | 19881 |
| | 10 L | 676 975 335 |
| ミニカラム<br>セルファイン ブチル | 1 x 5ml | 19905-51 |
| セルファイン ブチル | 100mL | 19905 |
| | 500mL | 19906 |
| | 5 L | 19879 |
| | 10 L | 676 973 335 |

（参考文献）

PDA Journal of GMP and Validation in Japan. “Purification of Recombinant Human Serum Albumin” Vol**2**,No.1(2000) Akinori Sumi, et al.

JNC株式会社

ライフケミカル推進室

〒100-8105 東京都大手町二丁目２番１号

電話 03-3243-6150 FAX 03-3243-6219

E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

URL: http://www.jnc-corp.co.jp/fine/en/cellufine